

8. 舘野馨, 南野 徹, 小室一成. 幹細胞医学の臨床 虚血肢に対する細胞移植治療 現状と問題点. 病理と臨床 27 : 348-353, 2009
9. 小林昌義, 古森公浩 動脈硬化に対する細胞移植療法 総合臨床 vol.58 No.10: 1817-19, 2009
10. 山之内大, 古森公浩 特集 喫煙の呼吸器・循環器に及ぼす影響-エビデンスに基づいて 喫煙と動脈疾患の関連について 『呼吸と循環』 vol.57 No.10: 1027-32, 2009
11. T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D. G. I. Scott, D. R. W. Jayne, K. Suzuki, H. Hashimoto. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe. Clin. Exp. Rheumatol. 2008 ;26(6): 1027-1033.
12. R. A. Watts, D. G. I. Scott, D. R. W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, K. Suzuki, H. Hashimoto. Renal Vasculitis in Japan and UK - are there differences in epidemiology? Nephrol. Dialysis Transplant. 23(12):3928-3931, 2008.
13. 橋本博史, 小林茂人, 藤元昭一, 湯村和子, 高橋啓, 猪原登志子, 平橋淳一, 鈴木和男: 血管炎の新分類基準, 新治療や発症機構研究の世界的動向 (前編). 日本医事新報 No. 4470:43-51, 2009
14. 橋本博史, 小林茂人, 藤元昭一, 湯村和子, 高橋啓, 猪原登志子, 平橋淳一, 鈴木和男: 血管炎の新分類基準, 新治療や発症機構研究の世界的動向 (後編). 日本医事新報 No. 4472:46-52, 2010
15. Seta N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kuwana M. Characterization of autoreactive T-cell clones to myeloperoxidase in patients with microscopic polyangiitis and healthy individuals. Clin Exp Rheumatol. 2009 ;27(5):826-9.
16. Suzuki Y, Takeda Y, Sato D, Kanaguchi Y, Tanaka Y, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Ozaki S, Horikoshi S, Tomino Y. Clinicoepidemiological manifestations of RPGN and ANCA-associated vasculitides: an 11-year retrospective hospital-based study in Japan. Mod Rheumatol. 2009. [Epub ahead of print]
17. Yoshida M, Sasaki M, Nakabayashi I, et al. Two types of myeloperoxidase - antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with a high affinity and a low affinity in small vessel vasculitis. Clin Exp Rheumatol. 2009;27(1 Suppl 52):S28-32.
18. Yoshida M, Ishibashi K, Hida S, et al. Rapid decrease of anti-beta-glucan antibody as an indicator for early diagnosis of carinii pneumonitis and deep mycotic infections following immunosuppressive therapy in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Clin

Rheumatol. 2009;28(5):565-71.

19. Nakabayashi K, Sumiishi A, Sano K, et al. Tubulointerstitial nephritis without glomerular lesions in three patients with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. Clin Exp Nephrol. 2009; 13(6): 605-13.

20. Sato J, Kawakami T, Nakabayashi K, et al. Multiple aortic aneurysms complicated by a rupture in the systemic lupus erythematosus: a case report. Pathol Res Pract. 2008;204(11):845-50.

## 2. 学会発表

1. 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 尾崎承一, 榎野博史: リウマチ性疾患の長期アウトカム ANCA 関連血管炎のアウトカム研究, 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2009 年 4 月 23 日~26 日

2. 山村昌弘, 佐田憲映, 針谷正祥, 藤井隆夫, 有村義宏, 榎野博史: 難治性血管炎調査研究班「わが国の難治性血管炎研究の現況—過去から未来へ—」 RemIT-JAV 研究: わが国の ANCA 関連血管炎の診療実態の把握を目指して, 第 50 回日本脈管学会総会, 東京, 2009 年 10 月 29 日~30 日

3. 佐田憲映, 榎野博史: 血管炎 顕微鏡的多発血管炎患者の厚生労働省臨床個人調査票データを用いた血管炎分類アルゴリズムの検討, 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2009 年 4 月 23 日~26 日

4. 松本佳則, 佐田憲映, 山中龍太郎,

三宅剛平, 杉山晃一, 高杉幸司, 山下美鈴, 若林宏, 川畑智子, 矢野隆介, 榎野博史: 膠原病患者における退院時ステロイド投与量とアウトカムに関する後向きコホート研究, 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2009 年 4 月 23 日~26 日

5. 能勢真人. 血管炎に関する基礎研究の進歩, 第 50 回日本脈管学会総会, 東京, 2009 年 10 月 29 日~30 日

6. 能勢真人. 膠原病のポリジーンネットワーク. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2009 年 11 月 13 日~15 日

7. 石津明洋. A 演説 (学術研究賞) モデル動物の解析による自己免疫疾患発症機序の多面的理解. 第 55 回日本病理学会秋期特別総会, 東京, 2009.

8. 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 飯沼千景, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.

9. 飯沼千景, 佐々木直美, 岩崎沙理, 外丸詩野, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応性ラット T 細胞の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.

10. 唐澤里江, 遊道和雄, 村田美奈子, 尾崎承一, 西岡久寿樹, 加藤智啓: 高安動脈炎の疾患特異的マーカー. 第 53 回リウマチ学会: 2009

11. 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 永井宏平, 有戸光美, 増子佳世, 末松直也, 岡本一起, 尾崎承一, 加藤智啓: 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索. 日本プロテオーム機構第 7 回大会: 2009

12. 高桑由希子, 黒川真奈絵, 大岡正道, 永井宏平, 有戸光美, 増子佳世, 末松直也, 岡本一起, 尾崎承一, 加藤智啓: 顕微鏡的多発血管炎患者血清ペプチドの網羅的探索. 第82回日本生化学会大会: 2009
13. 土屋尚之: リウマチ性疾患の遺伝的背景-共通性と異質性. 第53回日本リウマチ学会総会シンポジウム, 2009年4月24日, 東京
14. 土屋尚之: 膠原病の疾患関連遺伝子解析 (特別講演). 第5回生物学的製剤治療研究会. 2009年7月2日, 横浜
15. 長谷川均, 松本卓也, 金磊, 宮崎龍彦, 安川正貴, 能勢真人: 血管炎好発系 Mch5/lpr マウスの血管炎に対する CXCL16 アンタゴニストの抑制効果. 第54回日本リウマチ学会総会 (発表予定), 神戸, 2010年4月
16. Kamiishi T, Isobe M, et al: Novel Approaches to the Diagnosis and Assessment of Takayasu' s Arteritis: Serum MMP-3 Determination and Fluorodeoxyglucose PET/CT. 58<sup>th</sup> Annual Scientific Session, The American College of Cardiology, New Orleans, 2009年3月
17. Kamiishi T, Isobe M: Role of serum MMP-3 measurement in diagnosis and assessment of Takayasu' s arteritis: A sensitive and specific marker for diagnosis of recurrence. 日本循環器学会学術集会, 大阪, 2009年3月
18. Kamiishi T, Isobe M: Novel approaches to the diagnosis and assessment of Takayasu' s arteritis: Serum MMP-3 determination and FDG-PET/CT. 第73回日本循環器学会総会・学術集会, 大阪, 2009年3月20日~22日
19. 石原卓, 原口剛, 上石哲生, 磯部光章: 高安動脈炎の新しいバイオマーカーと画像診断. (シンポジウム9 難治性血管炎調査研究班: 難治性血管炎) 第50回日本脈管学会総会 2009年10月29-30日 東京
20. 石原卓, 原口剛, 上石哲生, 磯部光章: 新しいバイオマーカー- PTX3 と MMP-9 による高安動脈炎の活動性評価-. 第50回日本脈管学会総会 2009年10月29-30日 東京
21. Tateno K, Minamino T, Komuro I. Notch Signaling in Intrinsic Stem Cell is a Prerequisite for Therapeutic Angiogenesis. 2009/11/14-18 Orlando FL USA Circulation, 2009; 120: S1124.
22. Minamino T, Komuro I. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. 第41回日本動脈硬化学会総会シンポジウム 2009/07/17-18 下関 プログラム・抄録集 page165.
23. Minamino T, Komuro I. 血管再生治療の Update と次世代治療法の開発 第54回透析医学会学術集会・総会 ランチョンセミナー 2009/6/5-7 横浜 プログラム・抄録集 page69.
24. 太田 敬. 「バージャー病・血管形成異常」. 第3回 Japan Endovascular Treatments. 2009. 4. 12 (泉佐野市)

25. Kazuo Suzuki. Lecture on Epitope of MPO-ANCA in Workshop-I: Epitope specificity. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
26. Shouichi Fujimoto, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki. Incidence and clinical phenotype of ANCA-associated renal vasculitis: comparison between Japan and the UK. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, June 6-9, Lund, Sweden and Copenhagen, Denmark
27. Kobayashi S, Nakabayashi K, Yumura W, et al. Vascular damage index in Japanese patients with microscopic polyangiitis. Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop, 6-9, June, 2009. Acta Pathol Microet Immunol Scandinavica, 2009;117 :Suppl 127;81.
28. Kobayashi S, Matsumoto T, Hashimoto H, Takasaki Y. Clinical characteristics of Japanese patients with cutaneous polyarteritis nodosa. Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop, 6-9, June, 2009. Acta Pathol Microet Immunol Scandinavica, 2009;117 :Suppl 127;82.
29. Suzuki K, Tominaga K, Nagao T, Kobayashi S, et al. Resik epitopes of MPO-ANCA in Japan with MPA in Japan. Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop, 6-9, June, 2009. Acta Pathol Microet Immunol Scandinavica, 2009;117 :Suppl 127;168.
30. Ihara-Ito T, Muso E, Kobayashi S, et al. A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan. Acta Pathol Microet Immunol Scandinavica, 2009;117 :Suppl 127;173.
31. 藤元昭一, 他: ANCA関連血管炎; 疫学調査の国際比較と新たな分類に関する国際動向. 第52回日本腎臓学会総会シンポジウム「ANCA関連血管炎の基礎と臨床の融合」2009.6 (横浜)
32. 小林茂人, 藤元昭一, 鈴木和男: シンポジウム「わが国の難治性血管炎研究の現状—過去から未来へ—」血管炎の分類に関する世界動向. 第50回日本脈管学会, 2009.10 (東京)
33. 小林茂人, 藤元昭一, 鈴木和男: ANCA関連血管炎: 日本と欧米の比較およびEULAR/ACRの新しい血管炎の分類について. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月 (秋田)
34. 藤元昭一, 他: 宮崎県におけるANCA関連血管炎の疫学調査—発症率と欧米との差異を明らかにするために— 第15回MPO研究会, 2009年11月 (栃木)
35. 小林茂人, 藤元昭一, 鈴木和男: 抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎など疫学調査の種類と考え方—欧米と日本の差異: 発症率と罹病率: population-based studyとhospital-based study— 第15回MPO研究会, 2009年11月 (栃木)

## F. 知的所有権の出現登録状況

なし

### Ⅲ. 分担研究報告

【基礎・病理分科会】

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
基礎・病理研究分科会報告書

血管炎の病因・病態の解明と診断・治療への展開 2009

愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野 能勢真人

研究分担者

石津明洋	北海道大学大学院保健学科病理形態機能学	教授
岩月啓氏	岡山大学大学院医歯薬総合研究科学皮膚科学	教授
勝岡憲生	北里大学医学部皮膚科学	教授
加藤智啓	聖マリアンナ医科大学大学生化学	教授
鈴木和男	千葉大学大学院医学研究院免疫発生学・炎症制御学	教授
土屋尚之	筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学	教授
長谷川均	愛媛大学大学院医学系研究科生体統御内科学	准教授

研究協力者

鬼丸満穂	九州大学大学院医学研究院病理病態学	助教
澤井高志	岩手医科大学医学部先進機能病理学	教授
城謙 輔	仙台社会保険病院病理部	部長
高橋 啓	東邦大学医学部附属大橋病院病理学	教授

研究要旨

2008-2010 年度 3 年間の活動方針を「血管炎の病因・病態の解明と診断・治療への展開」とする中で、今年度は以下の成果を挙げた。「動物モデルを用いた血管炎の病因・病態の解明」については、① 新たに見出した野生型マウスゲノムに由来する血管炎抑制遺伝子 *Cd59a* のコンジェニックマウスを完成しその病理学的解析を行った。② 昨年に確立した無細胞タンパク質合成系を用いた網羅的な血管炎関連自己抗体のスクリーニング法ならびに capture ELISA 法を基盤として、新たな血管炎関連自己抗体を見出した。③ 壊死性血管炎発症 env-pX ラットに由来する血管内皮細胞反応性 T 細胞から血管炎惹起性 T 細胞クローンを単離しその TCR レパトアを解析した。④ anti-MPO 抗体と anti-LAMP2 抗体を利用した新しい糸球体腎炎モデルマウスを作製し、ANCA 関連血管炎モデルとしての有用性について検討した。⑤ CAWS 誘発冠動脈炎モデルマウスにおける Ang-2/Tie-2 system との関連性に焦点をあて、血漿 sTie-2 の治療標的としての有用性を解析した。⑥ 血管炎好発系 McH5/lpr マウスの血管炎に対する CXCL16 アンタゴニストの抑制効果を検討する中でその血管炎の治療薬としての有用性を見出した。「ヒト血管炎における病因・病態の解析」については、①

ヒト制御性 T 細胞の分化誘導を促進させる生理活性物質の同定し、その機序を明らかにし、その血管炎の治療への可能性を示した。② ANCA の対応抗原の自己抗体陽性者に特異的な翻訳後修飾について解析し、候補ペプチドを見出した。③ MPO-ANCA 関連血管炎症例の治療前の末梢血遺伝子発現プロファイルが血管炎の重症度よりも治療後の経過と関連することを見出した。④ *BLK* 領域多型と膠原病との関連を解析する中で、この領域が顕微鏡的多発血管炎とも関連することを見出した。⑤ 新規血管新生因子 Bv8 が関節リウマチ滑膜において発現することを見出した。⑥ 新たに設定した ANCA 関連血管炎の腎病理診断ガイドラインに沿った症例検討を行い、また、⑦ 皮膚血管炎・血管障害のスペクトラムと臨床・病理所見を集大成するかたちで、アトラス集を作成中である。

#### A. 研究目的

基礎・病理分科会の目的は、血管炎の病因・病態解明の基礎ならびに臨床研究を推進し、その成果を診断、治療に役立てることにあり、2008-2010 年度 3 年間の活動方針を「血管炎の病因・病態の解明と診断・治療への展開」としている。その活動計画としては「動物モデルを用いた血管炎の病因・病態の解明」と「ヒト血管炎における病因・病態の解析」の二つのミッションを設定しており、これらの中で、今年度遂行した成果の概要を下記にまとめた。詳細は、各分担研究者報告の項に記載した。

#### B. 研究方法

各分担者報告の項参照

(倫理面への配慮)

各分担者報告の項参照

#### C. D. 研究結果と考察

##### 1. 動物モデルを用いた血管炎の病因・病態の解明

###### ① 昨年度見出した野生型マウス MSM/Ms

に由来する血管炎抑制遺伝子 *Cd59a* について、そのコンジェニックマウス

MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup>を樹立し、病理組織学的解析を行った。その結果、MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup>

マウスにおいては、血管炎では、血管周囲

へのリンパ球浸潤を認めるものの、血管壁の破壊は見られないことを明らかにした。

従来、MRL/lpr マウスにおける血管炎は少なくともその初期像では免疫複合体の沈着を伴わず、完成した病像では肉芽腫性血管炎を示すところから、この血管炎は、補体の活性化に誘導される血管炎とは異なる機序が考えられてきたが、今回の事実から、この血管炎では補体の活性化が重要であること、あるいは最近注目されてきた Cd59a の補体制御因子としての機能以外の機能、例えば免疫応答における制御機能が、血管炎の発症に係わっている可能性が示唆された。(能勢)

②無細胞タンパク質合成系を用いた網羅的な血管炎関連自己抗体の探索方法ならびに capture ELISA 法の確立を基盤として、昨年度に引き続き、膠原病モデルマウスのゲノム交雑により作製したリコンビナントインブレットマウス MXH/lpr の 11 系統を用いての血管炎関連自己抗体を探索した。その結果、paralemmen に加えて新たな自己抗体を見出した。現在その病的意義について解析中である。(能勢)



③壊死性血管炎発症 env-pX ラットに由来する血管内皮細胞反応性 T 細胞株 PC4 から T 細胞クローン 1B8 (TCR  $\alpha$   $\beta$ , CD3+ CD4-, CD8-, CD25+) を単離し、それが肺に血管炎を誘導することを示し、また、その免疫細胞学的特性またその TCR レパトアについて TCRV  $\beta$  鎖の CDR 領域の解析を行った。(石津)

④ Anti-MPO 抗体と anti-LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein 2) 抗体を用い、LPS を共投与するなどして、半月体形成性腎炎や白血球浸潤を来す新しい糸球体腎炎モデルマウスを作製し、ANCA 関連血管炎モデルとしての有用性について検討した。(鈴木、高橋)

⑤ CAWS 誘発冠動脈炎モデルマウスにおいて血漿可溶性 Tie-2 の濃度が減少することを見いだしており、Ang-2/Tie-2 system との関連性に焦点をあて、血漿 sTie-2 の血管炎の診断、治療標的としての有用性について解析した。(鬼丸)

⑥血管炎好発系 McH5/1pr マウスの肉芽腫性血管炎において、CXCL16 が高発現していることを見出し、CXCL16 アンタゴニストの治療効果を検討した結果、顕著に血管炎の発症を抑制することを見出し、この血管炎の治療薬として有用性であることを示唆した。(長谷川)

## 2. ヒト血管炎における病因・病態の解析

① ヒト制御性T細胞の分化誘導を促進させる生理活性物質のスクリーニングを通じて、PPAR $\cdot$ および PPAR $\cdot$ アンタゴニストを同定し、その機序としてこれらがFoxp3の脱メチル化を促進することを明らかにし、こ

れらの血管炎の治療への可能性を示した。(長谷川)

② ANCAの対応抗原であるMPOならびにPR3の自己抗体陽性者に特異的な翻訳後修飾について解析し、分子量、pIの異なるペプチドを見出し、これらのimmunogenあるいは reactantとしての可能性について考察した。(加藤)

③ MPO-ANCA 関連血管炎発症例の治療前の末梢血単核球の遺伝子発現プロファイルが、血管炎の重症度よりも治療後の経過と関連することを見出した。(石津)

④ *BLK* (*B lymphoid tyrosine kinase*) 領域多型と膠原病との関連を解析する中で、この領域が SLE、RA、SSc のみならず、顕微鏡的多発血管炎とも関連することを見出した。(土屋)

⑤ 新規血管新生因子 Bv8 の関節リウマチ滑膜における発現を見出し、Bv8 が RA 滑膜における血管新生に関与していることを示唆した。(澤井)

⑥ 新たに設定した ANCA 関連血管炎の腎病理診断ガイドラインについて症例数を加え、その有用性について検討中である。(城)

⑦ 皮膚血管炎・血管障害のスペクトラムと臨床・病理所見を集大成し、アトラス集の完成に向けて進行中である。(岩月、勝岡)

## E. 研究発表

1. 論文発表 各分担者報告の項参照
2. 学会発表 各分担者報告の項参照

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 各分担者報告の項参照
2. 実用新案登録 各分担者報告の項参照
3. その他 各分担者報告の項参照

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

野生型マウスゲノムに由来する腎炎・血管炎抑制遺伝子の解析

愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野 能勢真人  
研究協力者 寺田美穂、路靈敏、中谷公彦、宮崎龍彦  
(愛媛大学大学院医学系研究科ゲノム病理学分野)  
古川宏、小野栄夫  
(東北大学大学院医学系研究科病理形態学分野)

研究要旨

膠原病のゲノム的しくみを明らかにする上で近交系マウス間交配による感受性遺伝子の解析は極めて有用であるが、従来解析されてきたモデルマウスの大部分は、*Mus musculus* 群の一亜群である *M. m. domesticus* であり、そのゲノム多型のプールは小さく、この亜群間交配での膠原病感受性遺伝子の探索はごく限られた遺伝子しか把握し得ない。膠原病モデルマウス MRL/lpr マウスもこの亜群に入る。そこで *M. m. domesticus* とは約 100 万年前に分岐したと考えられている *M. m. molossinus* から我が国で開発された近交系マウス MSM/Ms マウスと MRL/lpr マウスとの交配実験を行った結果、新たに糸球体腎炎感受性遺伝子座 3 座 (*Agnmr1*, *Agnmr2*, *Agnmr3*) を同定し、これらのいずれにおいても MSM アレルが優性遺伝様式を示す抑制遺伝子であることを見出した。そのうち第 2 染色体上の *Agnmr1* の位置的候補遺伝子として、量的形質、プロモーター多型の解析に基づき、従来補体の膜侵襲複合体を阻害するとされている GPI 結合タンパク質 *Cd59a* を同定した。ついでそのプロモーター多型をマーカーとして MRL/lpr マウスの *Cd59a<sup>MSM</sup>* リコンビナントコンジェニックマウスを製作したところ、*Cd59a<sup>MSM</sup>* が糸球体腎炎のみならず血管炎にも抵抗性を示すことを見出した。

A. 研究目的

内なる必然ともいえるべき膠原病のゲノム的しくみを明らかにする上においてゲノムが均一である近交系モデルマウスを用いた解析は極めて有用である。しかし従来開発されてきた近交系マウスの大部分は、*Mus musculus* 群の一亜群である *M. m. domesticus* で、そのゲノム多型のプールは小さい。膠原病モデルマウスとして用

いてきた MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/lpr) マウスもこの亜群に入り、この亜群間での交配実験による膠原病感受性遺伝子の探索は限られたゲノム多型しか把握し得ない。*Mus musculus* の亜群には、*domesticus* の他に、*musculus*、*molossinus*、*castaneus*、*bacterianus* などの亜群が存在し、これら

は約 100 万年前に分岐したと考えられている (図 1)。 *M. m. molossinus* は日本に生息する野生マウスで、 *musculus* と *castaneus* との交配に由来する。この亜群から国立遺伝研を中心に我が国独自に開発された近交系マウス MSM/Ms との交配により、従来 *domesticus* に由来する近交系マウス間の交配では得られない新たな膠原病感受性遺伝子の同定が可能になると考えられ、また、疾病の進化論を展開する上での貴重なツールともなり得る。そこで本研究では、MSM/Ms マウスの MRL/lpr マウスとの戻し交配マウスを作製し、膠原病の発症を抑制する多型遺伝子の同定とその機能の解明を目的とした。

## B. C. 研究方法と結果

### 1. MSM/Ms マウスゲノムが有する糸球体腎炎抵抗性遺伝子座の同定：

MRL/lpr x (MRL/lpr x MSM/Ms) F1 マウスのうち *lpr* 遺伝子ホモマウスを対象に二系統間の多型マイクロサテライトマーカーの遺伝子型と糸球体病変スコアの QTL 解析を行った。その結果、MSM アレルがヘテロにおいて、significant level の糸球体腎炎抑制効果を示す 3 座を同定した (図 2)。これらは第 2, 4, 13 染色体上の 54cM、54.8 cM、13.0 cM に位置し、それぞれ *Autoimmune glomerulonephritis MSM resistance 1* (*Agnmr1*)、*Agnmr2*、*Agnmr3* と命名した。

### 2. 糸球体腎炎抵抗性遺伝子座の候補遺伝子の解析：

*Agnmr1* 領域には補体制御遺伝子 *Cd59a* が位置しており、MRL/lpr と MSM/Ms マウスの

各腎糸球体を、顕微鏡下に laser capture microdissection (LCM) にて採取、RNA を抽出後、その cDNA を作製し、*Cd59a* の発現量を PCR にて解析した結果、MSM/Ms マウスの腎糸球体での *Cd59a* の発現は MRL/lpr マウスのそれに比し顕著に高いことを見出した (図 3)。

### 3. 候補遺伝子 *Cd59a* のプロモーター領域の解析：

*Cd59a* のプロモーター領域の多型が糸球体腎炎抵抗性を規定している可能性があり、そのプロモーターと考えられる領域の塩基配列を解析した結果、MRL/lpr と MSM/Mp マウス間で多型を見出した。そこで luciferase reporter assay により、このプロモーター領域の多型についての機能解析を行ったところ、MSM/Ms におけるルシフェラーゼ活性が MRL/lpr のそれに比し顕著に高いことを見出した (図 4)。

### 4. MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> コンジェニックマウスの作製とその病態解析：

*Agnmr1* が MSM マウスアレルを有するリコンビナントコンジェニック系の作製するなかで、幸運にもその交配系群に、*Cd59a* のプロモーター領域で組換えを起こしている個体を見出した。そこでこの個体を MRL/lpr マウスに戻し交配し 14 代繰り返した後、兄妹交配によりこの領域が MSM アレルのホモであるコンジェニックマウス MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> を樹立した。この系についてその組織病理学的解析を行い、各病変のスコアを測定したところ、糸球体腎炎のみならず、腎血管炎の発症が顕著に抑制され

ていることを見出した。(図5, 6)

#### D. 考察

本研究では、膠原病のゲノム的しくみを解明する上で重要な、ゲノム多型のプールの拡大を図った。その方法として、膠原病モデルマウス MRL/lpr が属する *M. m. domesticus* とは 100 万年の遺伝的隔たりがあるとされる *M. m. molossinus* に由来する MSM/Ms マウスを用いて、膠原病病像の感受性ゲノムを解析した。MSM/Ms 系マウスは我が国独自に開発された近交系マウスで、そのゲノムには多くの未知の疾病抑制遺伝子が潜在していると考えられており、その解析は、疾病と進化との関係を探る病態生物学的意義を明らかにするのみならず、疾病治療における新たな分子標的の開発にもつながるものと期待される。今まで MSM/Ms マウスとの交配実験を通じて、リンパ腫や癌に対する新たな抵抗性遺伝子の存在が明らかとなっており、また鴨川、能勢らは関節軟骨増殖性病変の新たな感受性遺伝子座を同定している。最近、MSM/Ms マウスのマイクロサテライトマーカー、SNPs データベース、また、BAC ライブラリーの作製が国立遺伝研を軸に精力的に行われており、これらを利用して我が国が発信する新たな疾病ゲノミクスの展開が期待される場所である。

本研究ではこの MSM/Ms マウスを MRL/lpr マウスへ戻し交配することにより、新たに糸球体腎炎、血管炎の位置的候補遺伝子として *Cd59a* を見出した。CD59 は、補体の膜侵襲複合体 (MAC) を阻害する GPI-anchored

glycoprotein で、以前能勢、岡田らは、ヒト CD59 が腎糸球体の血管内皮細胞に発現していることを明らかにしており、また、近年、*Cd59a* のノックアウトマウスで糸球体腎炎が増悪する事実が示されている。これらの事実からすれば CD59 は糸球体に沈着した免疫複合体が結合する補体の過度の活性化を抑制していると考えられる。それ故、MSM マウスアレルを有する *Cd59a* は、恒常的に *Cd59a* の発現量が高く、その結果、MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> では腎糸球体に沈着した免疫複合体に誘導される補体の活性化を制御する結果、糸球体腎炎の進行を抑制していると考えられる。

一方、今回血管炎の発症においても *Cd59a* が関与していることを見出したが、この事実は、MRL/lpr マウスの血管炎の発症機序を再評価する上で重要である。即ち、MRL/lpr マウスにおける血管炎は少なくともその初期像では免疫複合体の沈着を伴わず、完成した病像では肉芽腫性血管炎を示すところから、従来、この血管炎は、免疫複合体の沈着に伴う補体の活性化に誘導される血管炎とは異なる機序が考えられてきた。しかしながら、今回の事実は、この血管炎病像が完成するプロセスにおいて、補体の活性化が重要であること、あるいは最近注目されてきた *Cd59a* の補体制御因子としての機能以外の機能、例えば T、NK 細胞の活性化などの免疫応答における制御機能が、血管炎の発症に係わっている可能性が示唆される。

*Agnmr2* は、以前能勢らが MRL/lpr と

C3H/lpr マウスとの交配により、糸球体腎炎および血管炎感受性遺伝子座としてそれぞれマップした *Agnm2*、*Arvm2* と同じ領域に位置しており、C3H 系マウスアレルと共通した腎炎、血管炎の抑制遺伝子として興味を持たれ、今後候補遺伝子の同定が期待される。また、*Agnmr3* には *TCRgd* が位置し、*TCRgd* ノックアウトマウスでは腎炎発症が促進されることが報告されており、今後 MRL/lpr マウスと MSM/Ms マウスでの *TCRgd* 遺伝子多型とその発現動態の比較解析が期待される。

#### E. 結論

膠原病モデルマウス MRL/lpr とは約 100 万年前に分岐したと考えられている野生型近交系マウス MSM/Ms マウスとの交配実験を行った結果、新たに糸球体腎炎感受性遺伝子座 3 座を同定し、これらのいずれにおいても MSM アレルが優性遺伝様式を示す抑制遺伝子であることを見出した。そのうち第 2 染色体上の *Agnmr1* の位置的候補遺伝子として、量的形質、プロモーター多型の解析に基づき、従来補体の膜侵襲複合体を阻害するとされている GPI 結合タンパク質 *Cd59a* を同定した。ついでそのプロモーター多型をマーカーとして MRL/lpr マウスの *Cd59a<sup>MSM</sup>* リコンビナントコンジュニックマウスを作製したところ、*Cd59a<sup>MSM</sup>* が糸球体腎炎のみならず血管炎にも抵抗性を示すことを明らかにした。

#### F. 研究発表 論文発表

1. Soga Y, Nose M, Arita N, Komori H, Miyazaki T, Maeda T, Furuya K. Aneurysms of the renal arteries associated with segmental arterial mediolysis in a case of polyarteritis nodosa. *Pathology Int.* 59(3): 197-200, 2009
2. Yamashita M, Iwama N, Date F, Chiba R, Ebina M, Miki H, Yamauchi K, Sawai T, Nose M, Sato S, Takahashi T, Ono M. Characterization of lymphangiogenesis in various stages of idiopathic diffuse alveolar damage. *Human pathology.* 40(4): 542-551, 2009.
3. Soga Y, Komori H, Miyazaki T, Arita N, Terada M, Kamada K, Tanaka Y, Fujino T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M, Nose M. Toll-Like receptor 3 signaling induces chronic pancreatitis through the Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Tohoku J. Exp. Med.* 217(3): 175-184, 2009.
4. Kamada K, Arita N, Tsubaki T, Takubo N, Fujino T, Soga Y, Miyazaki T, Yamamoto H, Nose M. Expression of sphingosine kinase 2 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis contributing to apoptosis by a sphingosine analogue, FTY720. *Pathology Int.* 59(6): 382-389, 2009.
5. Kamao T, Miyazaki T, Soga Y, Komori H, Terada M, Ohashi Y, Nose M. Genetic dissociation of dacryoadenitis and sialadenitis in a sjögren's syndrome mouse model with common and different susceptibility gene loci. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(7): 3257-3265, 2009.
6. Isobe T, Oda H, Takayanagi N, Kunisue T, Komori H, Arita N, Ueda N, Nose M, Yamada T, Takahashi S, Tanabe S. Hexabromocyclododecanes in human adipose tissue from Japan. *Environ. Chem.* 6(4): 328-333, 2009.
7. Tanaka Y, Komori H, Mori S, Soga Y,

Tsubaki T, Terada M, Miyazaki T, Fujino T, Nakamura S, Kanno H, Sawasaki T, Endo Y, Nose M. Evaluating the role of rheumatoid factors in the development of rheumatoid arthritis in a mouse model with a newly established ELISA system. *Tohoku J Exp Med*, in press.

8. 鎌田一億、有田典正、椿崇仁、宮崎龍彦、藤野貴広、能勢真人. : 関節リウマチの滑膜増殖制御の新展開—マイクロアレイによる制御遺伝子の探索—. *臨床と研究* 86(6): 686-692, 2009.

9. 能勢真人、小森浩章. : モデルマウスから学ぶ血管炎のゲノムの仕組み. *J Jpn Coll Angiol.* 49(1): 11-16, 2009.

10. 能勢真人、小森浩章. : 血管炎発症のポリジーンネットワークモデル. *リウマチ科* 42(3):337-343, 2009.

#### 学会発表

1. 宮崎龍彦、田中ゆき、小野栄夫、能勢真人. オステオポンチン蛋白多型による樹状細胞抗原提示能修飾の新たなメカニズム. 第 98 回日本病理学会総会、京都、

2009. 5. 1-3

2. 能勢真人. 血管炎に関する基礎研究の進歩. 第 50 回日本脈管学会総会、東京、2009. 10. 29-31

3. 能勢真人. 膠原病のポリジーンネットワーク. 第 37 回日本臨床免疫学会総会、東京、2009. 11. 13-15

4. Tanaka Y, Soga Y, Nose M. A simple capture ELISA for recombinant proteins synthesized in cell-free system: Genetic dissociation of rheumatoid factors from arthritis in MRL/lpr mice. 第 39 回日本免疫学会総会、大阪、2009. 12. 2-4.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

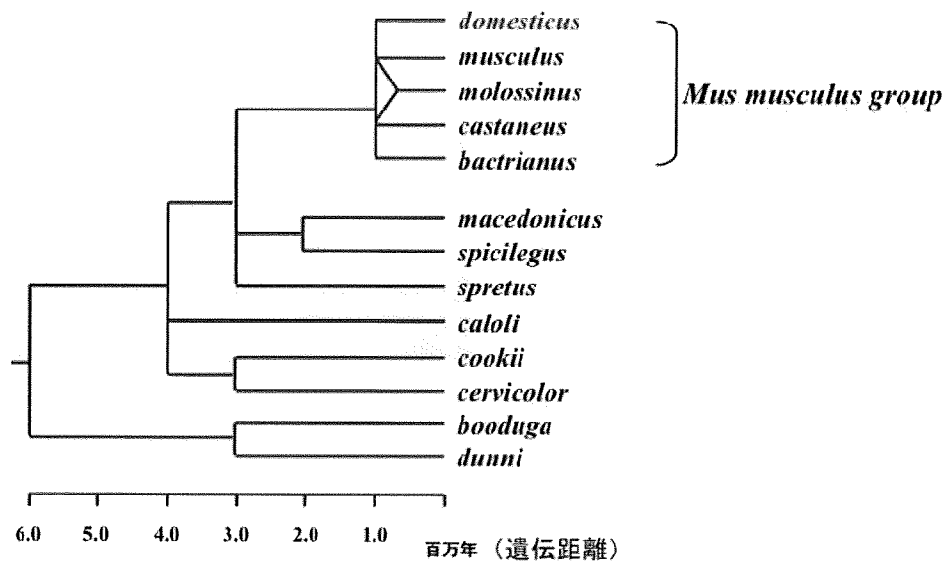


図1. マウスの系統樹。Mus musculus molossinus と M. m. domesticus との遺伝距離は約100万年とされている。(Silver LM, 1995, Yonekawa H, et al. 1988)

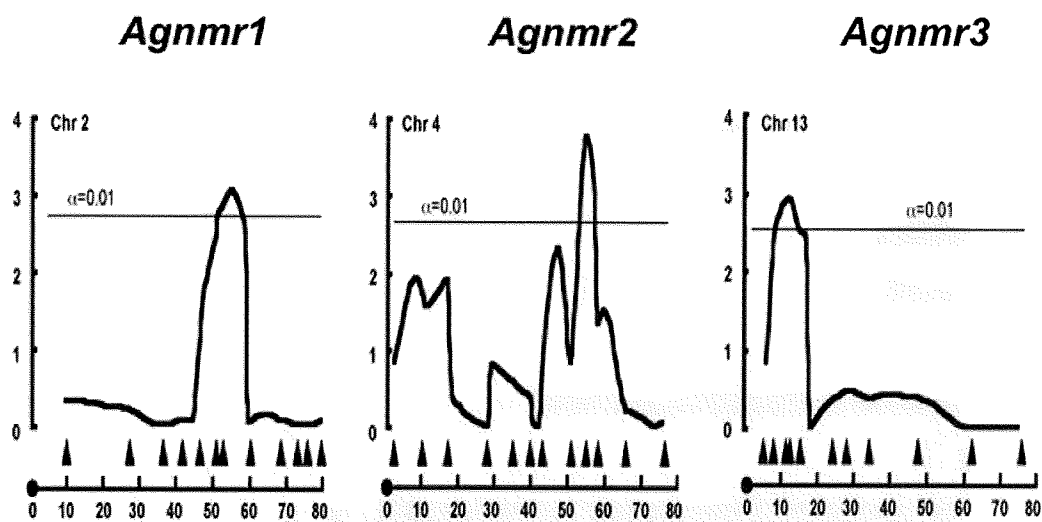


図2. MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> x (MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> x MSM/Ms) F1 マウスの内、*Fas*<sup>lpr</sup>ホモ接合体を有するマウスを用いた糸球体腎炎病変を指標とするQTL解析。第2, 4, 13染色体上にMSM/Msアレル存在下で糸球体病変の発症を抑制する有意なピークを認め、それぞれを *autoimmune glomerulonephritis MSM resistant gene 1 (Agnmr1)*、*Agnmr2*、*Agnmr3* と名付けた。

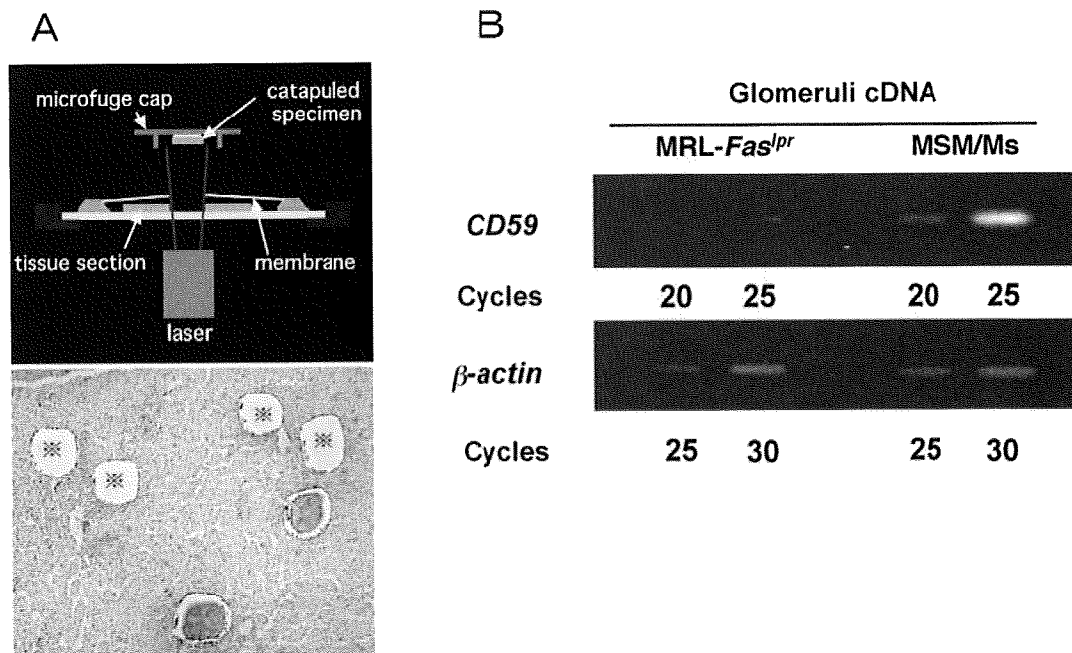


図3. *Agnmr3*の候補遺伝子 *Cd59a*の腎糸球体での発現。

A: Laser Capture Microdissection による腎糸球体の採取。\*は糸球体を切り取った痕を示す。B: 採取した糸球体より抽出した cDNA を用いた PCR による *Cd59a* の定量。MSM/Ms マウスでは MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> に比して発現量が多い。

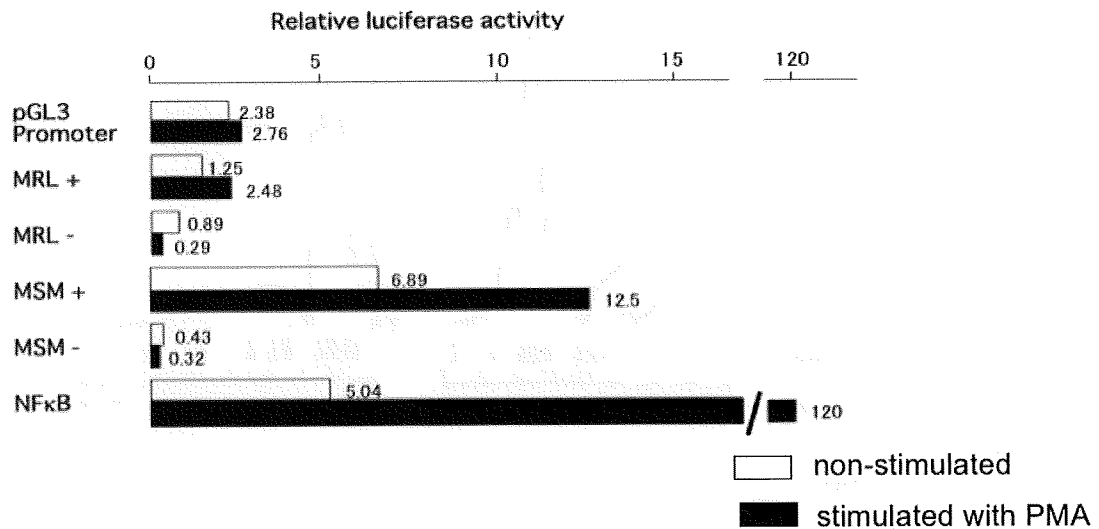


図4. *Cd59a*のプロモーター領域のルシフェラーゼレポーターアッセイ。MSM/Ms マウスでは MRL マウスに比して顕著にルシフェラーゼ活性の上昇が認められる。



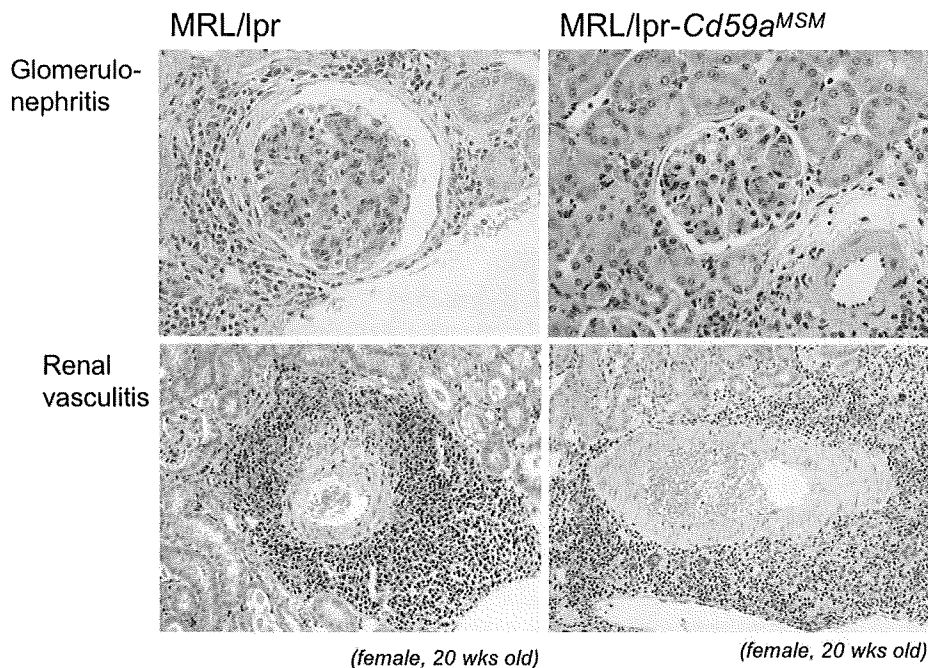


図5. MRL/lpr ならびに MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> マウスにおける腎糸球体ならびに血管病変。MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> マウスにおいては、糸球体では硝子様物質の沈着を認めるものの、炎症細胞浸潤はほとんど認められず、また、弓状動脈では、血管周囲へのリンパ球浸潤を認めるものの、血管壁の破壊は見らない。

Strains #	Indexes of the lesions	
	Glomeruli (max. 3.0)	Renal arteries (max. 2.0)
MRL/lpr (n=10)	2.51	1.67
MRL/lpr- <i>Cd59a</i> <sup>MSM</sup> (n=7)	0.73	0.59
	( <i>p</i> <0.01)	( <i>p</i> <0.01)

#Female, 20-24 weeks of age

図6. MRL/lpr および MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> マウスにおける糸球体腎炎、血管炎の発症頻度。MRL/lpr-*Cd59a*<sup>MSM</sup> マウスでは、糸球体腎炎ならびに血管炎の発症頻度の顕著な抑制を認める。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究年度終了報告書

血管炎の発症機序解明と新しい病態診断法の開発に関する研究

北海道大学大学院保健科学研究院 石津明洋

研究要旨

血管炎を発症する env-pX ラットを血管内皮細胞 (EC) で免疫し、摘出したリンパ節細胞を試験管内で繰り返し EC と反応させることにより、EC 依存的に増殖亢進を示す細胞株 PC4 を得た。PC4 は T 細胞、抗原提示細胞および抗原細胞 (EC) よりなる混合細胞株である。PC4 を同系野生型ラットに静注することにより肺に血管炎を誘導できたことから、PC4 には血管炎惹起性 T 細胞が含まれていると考えられた。そこで、PC4 から血管炎惹起性 T 細胞クローンを単離し、そのフェノタイプを解析した。得られた 3 つの T 細胞クローンはいずれも CD3 陽性、TCR  $\alpha\beta$  陽性で、V $\beta$  鎖は V $\beta$  8.6 を使用していた。また、CD4、CD8 はいずれも陰性で、CD25 は強陽性であった。これら T 細胞の TCR V $\beta$  鎖 CDR3 は RPWGGRF の 7 つのアミノ酸により構成されていた。これらの T 細胞クローンの認識分子を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。

また、MPO-ANCA 関連血管炎 12 症例の治療前ならびに治療開始後 1 週間の末梢血についてトランスクリプトーム解析を行った。12 症例の重症度は、軽症 6 例、重症 5 例、最重症 1 例であり、治療後の経過は、寛解維持 9 例、寛解後再燃 2 例、非寛解 1 例であった。MPO-ANCA 関連血管炎患者の治療前末梢血遺伝子発現プロファイルは、重症度よりはむしろ治療後の経過と相関することが示唆された。アレイ解析に用いた 12 症例のうち、治療開始後 6 週で寛解が導入され、その後も寛解が維持された 9 症例について、治療前と治療後 1 週間の末梢血について遺伝子発現の変化を検討したところ、58 遺伝子が治療後に有意な発現減少を示し、7 遺伝子が有意な発現増加を示した。寛解維持症例において、治療後に発現減少を示した遺伝子には、インターフェロン関連遺伝子や TNF 関連遺伝子、ケモカイン関連遺伝子など、MPO-ANCA 関連血管炎の病態増悪に関与すると考えられる遺伝子が含まれていた。

A. 研究目的

モデル動物を用いて血管炎の発症機序を解明する。また、MPO-ANCA 関連血管炎の患者末梢血を用いて、本疾患の病態や治療前後に関連する遺伝子群を明らかにする。

B. 研究方法

血管炎を発症する env-pX ラットから抽出した血管内皮細胞 (EC) 反応性細胞株 PC4 から、限界希釈法により血管炎惹起性 T 細胞クローンを単離し、そのフェノタイプを解析した。

MPO-ANCA 関連血管炎 12 症例の治療前および治療後 1 週間の末梢血をサンプルとし、Affimetrix 社 Gene chip を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。12 症

例の重症度は、軽症 6 例、重症 5 例、最重症 1 例であり、治療後の経過は、寛解維持 9 例、寛解後再燃 2 例、非寛解 1 例であった。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の動物実験指針に基づいて行った。

患者検体の採取にあたっては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の掲げる遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、各々の検体採取機関の倫理委員会の承認を受け、全例インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

PC4 から限界希釈法により 3 つの T 細胞ク

ローン (1B8, 4E1, 4D6) を単離した。3つのクローンは、いずれも同系野生型ラットに静注することにより、肺その他の臓器に血管炎を誘導したことから、血管炎惹起性T細胞と考えられた。3つのクローンは、いずれもCD3陽性、TCR $\alpha\beta$ 陽性で、V $\beta$ 鎖はV $\beta$ 8.6を使用していた。また、CD4、CD8はいずれも陰性で、CD25は強陽性であった。それらT細胞のTCR V $\beta$ 鎖CDR3はRPWGGRFの7つのアミノ酸により構成されており、結果的に3つのクローンは同一のものであった。

MPO-ANCA関連血管炎患者の治療前末梢血遺伝子発現プロファイルは、重症度よりはむしろ治療後の経過と相関することが示唆された。アレイ解析に用いた12症例のうち、治療開始後6週で寛解が導入され、その後も寛解が維持された9症例について、治療前と治療後1週間の末梢血について遺伝子発現の変化を検討したところ、58遺伝子が治療後に有意な発現減少を示し、7遺伝子が有意な発現増加を示した。

#### D. 考察

自己EC反応性血管炎惹起性T細胞クローンの認識分子を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。

治療により寛解維持が得られたMPO-ANCA関連血管炎患者の末梢血において、治療後に発現減少を示した遺伝子には、インターフェロン関連遺伝子やTNF関連遺伝子、ケモカイン関連遺伝子などが含まれていた。これらの遺伝子は免疫反応や炎症反応において重要な役割を果たしていることが知られており、MPO-ANCA関連血管炎の病態増悪に関与している可能性が考えられる。

#### E. 結論

血管炎を発症する env-pX ラットから、自己ECに反応し血管炎を惹起するT細胞クローンを樹立した。樹立したT細胞クローンはTCR V $\beta$ 8.6を有するCD4陰性、CD8陰性、CD25強陽性のT細胞であった。今後、このT細胞クローンの認識分子を同定することにより、血管炎の標的分子を明らかにすることができると考えられる。

また、MPO-ANCA関連血管炎患者の末梢血トランスクリプトーム解析を行い、MPO-ANCA関連血管炎の病態や治療予後に関連する遺伝子群を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, Fugo K, Otsuka N, Tanaka K, Kasahara M. Exclusive expression of proteasome subunit  $\beta$ 5t in the human thymic cortex. *Blood* 113: 5186-5191, 2009.
- 2) Sasaki N, Ogawa Y, Iinuma C, Tomaru U, Katsumata K, Otsuka N, Kasahara M, Yoshiki T, Ishizu A. Human endogenous retrovirus-R env glycoprotein as possible autoantigen in autoimmune disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 889-896, 2009.
- 3) Ishizu A, Abe A, Miyatake Y, Baba T, Iinuma C, Tomaru U, Yoshiki T. Cyclic AMP response element binding protein is implicated in IL-6 production from arthritic synovial cells. *Modern Rheumatol* (in press)
- 4) 石津明洋, 吉木 敬. env-pX ラットの血管炎発症機序. *脈管学* 49: 17-20, 2009.
- 5) 石津明洋, 外丸詩野, 村井太一, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎の予後予測因子の探索. *脈管学* 49: 45-51, 2009.

##### 2. 学会発表

- 1) 石津明洋. A演説(学術研究賞)モデル動物の解析による自己免疫疾患発症機序の多面的理解. 第55回日本病理学会秋期特別総会, 東京, 2009.
- 2) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 飯沼千景, 村井太一, 山本智宏, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第98回日本病理学会総会, 京都, 2009.
- 3) 飯沼千景, 佐々木直美, 岩崎沙理, 外丸詩野, 石津明洋. 自己血管内皮細胞反応

- 性ラット T 細胞の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.
- 4) 外丸詩野, 石津明洋, 高橋里実, 鈴木小百合, 小原次郎, 風巻 拓, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. プロテアソームのキモトリプシン様活性の異常と病態形成に関する検討. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.
- 5) 鈴木小百合, 外丸詩野, 石津明洋, 高橋里実, 小原次郎, 風巻 拓, 宮武由甲子, 村田茂穂, 田中啓二, 笠原正典. 胸腺プロテアソームの発現と T 細胞分化に関する検討. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.
- 6) 岩崎沙理, 馬場智久, 益田紗季子, 勝俣一晃, 外丸詩野, 笠原正典, 石津明洋. ヒト末梢血に検出される CD8 陽性単球の解析. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.
- 7) 石津明洋, 外丸詩野, 岩崎沙理, 吉木 敬, 尾崎承一. MPO-ANCA 関連血管炎患者末梢血のトランスクリプトーム解析. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2009.
- 8) Iinuma C, Waki M, Yamaguchi M, Sasaki N, Tomaru U, Ishizu A. Establishment and analysis of vasculitogenic T cell clone. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪 2009.
- 9) Suzuki S, Tomaru U, Ishizu A, Takahashi S, Ohara J, Kazamaki T, Miyatake Y, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. Skewed T cell development in mice with ectopic expression of thymoproteasome. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪 2009.
- 10) Masuda S, Iwasaki S, Baba T, Katsumata K, Tomaru U, Kasahara M, Ishizu A. Analysis of CD8 positive monocytes and granulocytes in human peripheral blood. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪 2009.
- 11) 木内隆之, 外丸詩野, 高田明生, 武藤修一, 大岡智学, 村上達哉, 宮武 司, 大場淳一, 青木秀俊, 石津明洋. 動脈破裂をきたした von Recklinghausen 病の 2 症例: 破裂血管における hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  発現の検討. 第 14 回血管病理研究会, 佐賀, 2009.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許出願  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。